研究用

KAPA SYBR® FAST qPCRキット

マスターミックス（2×）ユニバーサル

KAPABIOSYSTEMS

クイックガイド

Cat.No	Kit Size
KK4600	1×1ml（100回用／20μl反応）
KK4601	1×5ml（500回用／20μl反応）
KK4602	2×5ml（1,000回用／20μl反応）
KK4612	トライアルキット（30回用／20μl反応）

● 内容

	KK4600	KK4601	KK4602	KK4612
qPCR Master Mix (2×)*	○	○	○	○
Rox Reference Dye High（50×）	○	○	○	○
Rox Reference Dye Low（50×）	○	○	○	○

● 保存　−20℃（遮光）1年間

＊最終濃度2.5mMの$MgCl_2$を含みます。

■ 製品説明

KAPA SYBR® FAST qPCR マスターミックス キットには、まったく新しい方法で設計されたDNAポリメラーゼ酵素（エンジニア酵素）が含まれており、通常より高濃度のSYBR® GreenⅠ存在下でも増幅可能となりました。
このKAPA SYBR® DNA ポリメラーゼは、微量なテンプレートのリアルタイム定量PCR（qPCR）反応条件下でも、SN比（蛍光）、スレッシュホールドサイクル（Ct）、直線性、および感度を劇的に改善することが可能となりました。また、バッファーはGCやATリッチな難しいテンプレートの増幅効率を高めるよう調製しています。
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) ユニバーサルは、プライマーとテンプレート以外のすべてのコンポーネントを含む、レディートウーユースの溶液で反応液の調製が簡単です。

本製品の適応機種

1. ABI GeneAmp®5700、PRISM 7000/7700、7300/7500 Real-Time PCR System、StepOne™/StepOne™ Plus Real-Time PCR System ViiA™7（Applied Biosystems社）
2. Thermal cycler Dice Real Time System （製品コードTP800/TP850など）
3. Stratagene Mx3000P®, Mx3005P™, Mx4000®
   Rotor-Gene™; DNA Engine Opticon™, Opticon® 2, Chromo 4™ Real-Time Detector; Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®,Roche LightCycler® 480, Bio-Rad CFX96, Illumina Eco™
   ＊ キャピラリータイプのLight Cycler®には対応していません。

■ アプリケーション

KAPA SYBR® FAST qPCRキットは、次のアプリケーションに適しています。

- 遺伝子発現解析
- 微量コピー数の遺伝子検出
- マイクロアレイのバリデーション
- ノックダウン遺伝子のバリデーション

■ KAPA SYBR® FAST qPCRの反応プロトコール

使用する機種により 1 ～ 3 の反応プロトコールがあります。

1 『ABI社製装置』
ABI GeneAmp® 5700、PRISM® 7000/7700およびApplied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System、StepOne™/StepOne™ Plus Real-Time PCR System ViiA™7を用いる場合

2 『Takara社製装置』
Thermal Cycler Dice® Real Time Systemを用いる場合

3 『ABI社, Takara社製以外の装置』
Stratagene Mx3000P®, Mx3005P™, Mx4000®
Rotor-Gene™；DNA Engine Opticon™, Opticon® 2, Chromo 4™ Real-Time Detector；Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®,Roche LightCycler® 480, Bio-Rad CFX96, Illumina Eco™を用いる場合

1 『ABI社製装置』用

ABI GeneAmp® 5700、PRISM® 7000/7700およびApplied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System、StepOne™/StepOne™ Plus Real-Time PCR System ViiA™7を用いる場合

＊各機種の取扱説明書に従って操作して下さい

1. 基本的なqPCR反応条件 (Total 20または50μl)

	20μl反応	50μl反応	最終濃度
KAPA SYBR® FASTqPCRMasterMix (2×) Universal*1)	10μl	25μl	1×
Forward Primer (10μM)*2)	0.8μl	2.0μl	400nM
Reverse Primer (10μM)*2)	0.8μl	2.0μl	400nM
Template DNA (<100 ng)*3)	2.0μl	4.0μl	
ROX High/Low*4)	0.4μl	1.0μl	1×
滅菌蒸留水	up to 20 μl*5)	up to 50μl*5)	

＊1：KAPA SYBR® FASTqPCR、dNTP Mixture、Mg2+およびSYBR® Green I を含みます。
＊2：最終primer濃度は0.4μMで良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題がある時は0.2〜1.0μMの範囲で最適な濃度を検討すると良いです。
＊3：テンプレート溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なります。段階希釈して適当な添加量を検討して下さい。DNA テンプレート 100 ng以下を用いることが望ましいです。また、RT-PCRでcDNA (RT反応液) をテンプレートとして添加する場合 は、PCR反応液容量の10%以下になるようにして下さい。
＊4：ROX添加は以下を参照して下さい。
＊5：96ウェルプレート、シングルチューブおよび8連チューブでの反応は50μl反応系で行って下さい。384ウェルプレートでの反応は20μl反応系で行って下さい。

適応機種	ROX量／20μl (50μl) 反応	
	ROX High (50×)	ROX Low (50×)
ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT StepOne, StepOnePlus	0.4μl (1.0μl)	—
ABI 7500, ViiA™7	—	0.4μl (1.0μl)

qPCRプログラム

下記のシャトルPCR標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこの標準プロトコールを試し、必要に応じて条件を検討して下さい。Tm値が低めのプライマーなど、シャトルPCRでの反応が難しい場合には、3ステップPCRを行って下さい。

ステップ	温度	反応時間	サイクル数
Enzyme activation	95℃	30 sec*1)	1
Denature Anneal/extend*2)	95℃ 60℃	5 sec 30−60 sec	40
Dissociation	PCR機器の取扱説明書に順じます		

＊1：95℃ 30sec であれば酵素は充分に活性化されますが、ゲノムDNAなどの場合には、3minまで延長が必要な場合があります。
＊2：3ステップサイクルで行う場合、最適な温度で20秒間annealing後に、72℃ 10−40秒のextentionを行こなって下さい。

2. FastプログラムでのqPCR反応条件 (Total 20μl)

	20μl反応	最終濃度
KAPA SYBR® FASTqPCRMasterMix (2×) Universal	10μl	1×
Forward Primer (10μM)	0.4μl	200nM
Reverse Primer (10μM)	0.4μl	200nM
Template DNA		<20ng/20μl
ROX High／Low*1)	—	
滅菌蒸留水	up to 20μl	

＊1：ROX添加は以下を参照して下さい。

適応機種	ROX量／20μl (50μl) 反応	
	ROX High (50×)	ROX Low (50×)
ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HTStepOne, StepOnePlus	0.4μl (1.0μl)	—
ABI 7500, ViiA™7	—	0.4μl (1.0μl)

qPCRプログラム

ステップ	温度	反応時間	サイクル数
Enzyme activation	95℃	20sec — 3min*1)	1
Denature Anneal/extend*2)	95℃ 45 — 68℃	1— 3 sec ≧20 sec*3)	40
Dissociation	PCR機器の取扱説明書に順じます		

＊1：95℃ 20sec であれば酵素は充分に活性化されますが、ゲノムDNAなどの場合には、3minまで延長が必要な場合があります。
＊2：3ステップサイクルで行う場合、最適な温度で20秒間annealing後に、72℃ 1秒のextentionを行こなって下さい。
＊3：時間の短縮は20秒以下にはしないで下さい。

2 『Takara社製装置』用

Thermal Cycler Dice® Real Time Systemを用いる場合

＊各機種の取扱説明書に従って操作して下さい

1. 基本的なqPCR反応条件（Total 25μl）

	25μl反応	最終濃度
KAPA SYBR® FASTqPCRMasterMix（2×）Universal*1)	12.5μl	1×
Forward Primer（10μM)*2)	1.0μl	400nM
Reverse Primer（10μM)*2)	1.0μl	400nM
Template DNA（＜100 ng)*3)	2.0μl	
滅菌蒸留水	up to 25 μl*4)	

＊1：KAPA SYBR® FASTqPCR、dNTP Mixture、Mg2+およびSYBR® Green I を含みます。
＊2：最終primer濃度は0.4μMで良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題がある時は0.2～1.0μMの範囲で最適な濃度を検討すると良いです。
＊3：テンプレート溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なります。段階希釈して適当な添加量を検討して下さい。DNA テンプレート100 ng以下を用いることが望ましいです。また、RT-PCRでcDNA（RT反応液）をテンプレートとして添加する場合 は、PCR反応液容量の10%以下になるようにして下さい。
＊4：反応液量は25μlを推奨します。

■ qPCRプログラム

下記のシャトルPCR標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこの標準プロトコールを試し、必要に応じて条件を検討して下さい。Tm値が低めのプライマーなど、シャトルPCRでの反応が難しい場合には、3ステップPCRを行います。

ステップ	温度	反応時間	サイクル数
Enzyme activation	95℃	30 sec*1)	Hold
Denature Anneal/extend*2)	95℃ 60℃	5 sec 30−60 sec	40
Dissociation	PCR機器の取扱説明書に順じます		

＊1：95℃ 30sec であれば酵素は充分に活性化されますが、ゲノムDNAなどの場合には、3minまで延長が必要な場合があります。
＊2：3ステップサイクルで行う場合、最適な温度で20秒間annealing後に、72℃ 10−40秒のextentionを行こなって下さい。

2. FastプログラムでのqPCR反応条件（Total 20μl）

	20μl反応	最終濃度
KAPA SYBR® FASTqPCRMasterMix（2×）Universal	10μl	1×
Forward Primer（10μM）	0.4μl	200nM
Reverse Primer（10μM）	0.4μl	200nM
Template DNA		＜20ng/20μl
滅菌蒸留水	up to 20μl	

■ qPCRプログラム

ステップ	温度	反応時間	サイクル数
Enzyme activation	95℃	20sec−3min*1)	1
Denature Anneal/extend*2)	95℃ 45-68℃	1−3 sec ≧20 sec*3)	40
Dissociation	PCR機器の取扱説明書に順じます		

＊1：95℃ 20sec であれば酵素は充分に活性化されますが、ゲノムDNAなどの場合には、3minまで延長が必要な場合があります。
＊2：3ステップサイクルで行う場合、最適な温度で20秒間annealing後に、72℃ 1秒のextentionを行こなって下さい。
＊3：時間の短縮は20秒以下にはしないで下さい。

3 『ABI社, Takara社製以外の装置』用

Stratagene Mx3000P®, Mx3005P™, Mx4000®
Rotor-Gene™；DNA Engine Opticon™, Opticon® 2, Chromo 4™ Real-Time Detector；Mastercycler® ep realplex,
Smart Cycler®, Roche LightCycler® 480, Bio-Rad CFX96, Illumina Eco™を用いる場合

＊ キャピラリータイプのLight Cycler®には対応していません。
＊ 各機種の取扱説明書に従って操作して下さい

1. 基本的なqPCR反応条件

まずは、現状の反応組成、qPCRプログラムをそのままご使用下さい。
新規で設定される場合は、以下をご参照のうえ、各機種の標準的な条件に調整して下さい。

	50μl反応	最終濃度
KAPA SYBR® FASTqPCRMasterMix（2×）Universal*1)	25μl	1×
Forward Primer（10μM）*2)	2.0μl	400nM
Reverse Primer（10μM）*2)	2.0μl	400nM
Template DNA（＜100 ng）*3)	4.0μl	
ROX High/Low*4)	1.0μl	1×
滅菌蒸留水	up to 50μl	

＊1：KAPA SYBR® FASTqPCR、dNTP Mixture、Mg2+およびSYBR® Green I を含みます。
＊2：最終primer濃度は0.4μMで良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題がある時は0.2～1.0μMの範囲で最適な濃度を検討すると良いです。
＊3：テンプレート溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なります。段階希釈して適当な添加量を検討して下さい。DNA テンプレート100 ng以下を用いることが望ましいです。また、RT-PCRでcDNA（RT反応液）をテンプレートとして添加する場合 は、PCR反応液容量の10%以下になるようにして下さい。
＊4：ROX添加は以下を参照下さい。

適応機種	ROX量／50μl反応	
	ROX High（50×）	ROX Low（50×）
Stratagene Mx3000P®, Mx3005P™, Mx4000®	—	1.0μl
Rotor-Gene™；DNA Engine Opticon™, Opticon® 2, Chromo 4™ Real-Time Detector；Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®, Roche LightCycler® 480, Bio-Rad CFX96, Illumina Eco™	添加の必要はありません	

■ qPCRプログラム

下記のシャトルPCR標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこの標準プロトコールを試し、必要に応じて条件を検討して下さい。Tm値が低めのプライマーなど、シャトルPCRでの反応が難しい場合には、3ステップPCRを行います。

ステップ	温度	反応時間	サイクル数
Enzyme activation	95℃	30 sec*1)	1
Denature Anneal/extend*2)	95℃ 60℃	5 sec 30－60 sec	40
Dissociation	PCR機器の取扱説明書に順じます		

＊1：95℃ 30sec であれば酵素は充分に活性化されますが、ゲノムDNAなどの場合には、3minまで延長が必要な場合があります。
＊2：3ステップサイクルで行う場合、最適な温度で20秒間annealing後に、72℃ 10－40秒のextentionを行なって下さい。

2. Fastプログラムでの qPCR反応条件（Total 20μl）

	20μl反応	最終濃度
KAPA SYBR® FASTqPCRMasterMix（2×）Universal	10μl	1×
Forward Primer（10μM）	0.4μl	200nM
Reverse Primer（10μM）	0.4μl	200nM
Template DNA		＜20ng/20μl
ROX High／Low*1)	—	
滅菌蒸留水	up to 20μl	

＊1：ROX添加は以下を参照下さい。

適応機種	ROX量／20μl反応	
	ROX High（50×）	ROX Low（50×）
Stratagene Mx3000P®, Mx3005P™, Mx4000®	—	0.4μl
Rotor-Gene™；DNA Engine Opticon™, Opticon® 2, Chromo 4™ Real-Time Detector；Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®, Roche LightCycler® 480, Bio-Rad CFX96, Illumina Eco™	添加の必要はありません	

■ qPCRプログラム

ステップ	温度	反応時間	サイクル数
Enzyme activation	95℃	20sec — 3min*1)	1
Denature Anneal/extend*2)	95℃ 45 — 68℃	1— 3 sec ≧20 sec*3)	40
Dissociation	PCR機器の取扱説明書に順じます		

＊1：95℃ 20sec であれば酵素は充分に活性化されますが、ゲノムDNAなどの場合には、3minまで延長が必要な場合があります。
＊2：3ステップサイクルで行う場合、最適な温度で20秒間annealing後に、72℃ 1秒のextentionを行なって下さい。
＊3：時間の短縮は20秒以下にはしないで下さい。

日本ジェネティクス株式会社 http://www.n-genetics.com
本　　社：〒112-0004 東京都文京区後楽１丁目４番14号 後楽森ビル18F Tel. 03 (3813) 0961 Fax. 03 (3813) 0962
西日本営業所：〒604-8277 京都府京都市中京区西洞院通御池下ル565番地 ラフィーネ御池3F Tel. 075 (257) 5421 Fax. 075 (257) 5422

2013年5月現在のものです。製品は改良のため予告なく変更する場合があります。10PR1305A1K